

04.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

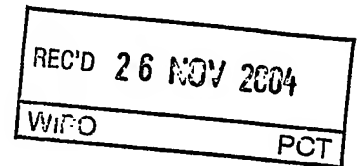
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 7]

出 願 人
Applicant(s): 第一製薬株式会社
 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

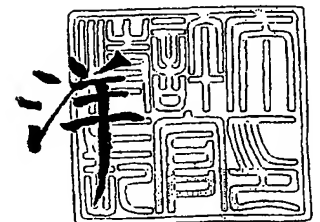


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2004-310183

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP03-1159
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61P 03/10
C12N 09/50
C12Q 01/37

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地
幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内
【氏名】 土居 洋文

【発明者】
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】 斎藤 憲

【特許出願人】
【識別番号】 000002831
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【特許出願人】
【識別番号】 500520628
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 067070
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害することを特徴とする細胞死阻害方法。

【請求項 2】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害する化合物を少なくとも 1 つ以上用いることを特徴とする細胞死阻害方法。

【請求項 3】

細胞死が膵臓 β 細胞の細胞死である請求項 1 または 2 に記載の細胞死阻害方法。

【請求項 4】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害することを特徴とする糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項 5】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、HtrA2 による CREBL1 および／または ATF6 の分解、を可能にする条件下、CREBL1 若しくは ATF6 および／または HtrA2 を化合物と接触させ、CREBL1 または ATF6 を検出することができるシグナルおよび／マーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／マーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出することにより、化合物が CREBL1 または ATF6 の分解を阻害するか否かを決定する方法。

【請求項 6】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、HtrA2 による CREBL1 および／または ATF6 の分解、を可能にする条件下、CREBL1 若しくは ATF6 および／または HtrA2 を化合物と接触させ、CREBL1 または ATF6 の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、あるいは CREBL1 の分解物または ATF6 の分解物の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、化合物が CREBL1 または ATF6 の分解を阻害するか否かを決定する方法。

【請求項 7】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害する化合物を少なくとも 1 つ以上含んでなる細胞死阻害剤。

【請求項 8】

細胞死が膵臓 β 細胞の細胞死である請求項 7 に記載の細胞死阻害剤。

【請求項 9】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害する化合物を少なくとも 1 つ以上含んでなる糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項 10】

HtrA2、HtrA2 をコードするポリヌクレオチドおよび HtrA2 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つと、CREBL1、ATF6、CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチド、および CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなる試薬キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】H t r A 2によるCREBL1および／またはATF6の分解を阻害することによる糖尿病の治療方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、の阻害に関する。より具体的には、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、を阻害することを特徴とする細胞死阻害方法、あるいは該分解を阻害する化合物を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする細胞死阻害方法、例えば膵臓β細胞の細胞死阻害方法に関する。また、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、を阻害することを特徴とする糖尿病の防止方法および／または治療方法に関する。さらに、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、を阻害する化合物の同定方法に関する。また、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる細胞死阻害剤、例えば膵臓β細胞の細胞死阻害剤に関する。さらに、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる糖尿病の防止剤および／または治療剤に関する。また、H t r A 2、H t r A 2をコードするポリヌクレオチドおよびH t r A 2をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、CREBL1、ATF6、CREBL1またはATF6をコードするポリヌクレオチド、およびCREBL1またはATF6をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

生物は、細胞の生存とアポトーシス（細胞死）を調節することで外界のストレスから身を守るが、生存とアポトーシス制御機構の調節の乱れによる過剰な細胞死は、種々の疾患を招く可能性がある（非特許文献1）。

【0003】

近年、ストレスを感知し調節する場としてミトコンドリアや小胞体の研究が進み、ミトコンドリア膜に局在するH t r A 2蛋白質（以下、H t r A 2と称する）は、UVや熱ショック等のストレスによりミトコンドリア膜から細胞質へ移行し（非特許文献2、4、5および6）、カスパーゼ依存的な細胞死とカスパーゼ非依存的な細胞死の二つの細胞死誘導を行うことが報告された（非特許文献3）。H t r A 2は、前駆体蛋白質（配列番号2）からN末133アミノ酸が切り離された成熟型（配列番号4）になり、ミトコンドリアから細胞質に移行する。

【0004】

カスパーゼ非依存的な細胞死は、H t r A 2自身のセリンプロテアーゼとしての性質に依存し、その前駆体蛋白質のアミノ酸配列中306番目（成熟型においては174番目に相当する）のセリンをアラニンに置換した変異体〔以下、H t r A 2（S306A）と称する。〕ではカスパーゼ非依存的な細胞死は引き起こされないことが知られている（非特許文献4-6）。このようにH t r A 2は、カスパーゼ非依存的な細胞死を誘導する機構において重要な役割を担う因子である。

【0005】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【非特許文献1】「細胞工学」、2002年、第21巻、第4号、p. 360-394。

【非特許文献2】ヤマガチ（H. Yamaguchiら、「キャンサーリサーチ（Cancer Research）」、2003年、第63巻、p. 1483-1489。

【非特許文献3】「実験医学」、2002年、第20巻、第1号、p. 73-75。

【非特許文献4】スズキ（Y. Suzuki）ら、「モレキュラー セル（Mole

cular Cell)」、2001年、第8巻、p. 613-621。

【非特許文献5】ヘッジ(R. Hegde)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 432-438。

【非特許文献6】マーチンズ(L. M. Martins)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 439-444。

【非特許文献7】「内科」、2003年、第91巻、第1号、p. 63-67。

【非特許文献8】カウフマン(R. J. Kaufman)ら、「ジャーナル クリニカル インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、2002年、第110巻、p. 1389-1398。

【非特許文献9】ハゼ(K. Haze)ら、「バイオケミカル ジャーナル (Biochemical Journal)」、2001年、第355巻、p. 19-28。

【非特許文献10】ウルマー(K. M. Ulmer)、「サイエンス (Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

【非特許文献11】「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

【非特許文献12】「ペプチド シンthesis (Peptide Synthesis)」、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (New York)、1996年。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

近年、小胞体ストレスによって膵臓の β 細胞が細胞死を起こし、糖尿病を発症することが報告されている。膵臓 β 細胞はインスリンの産生分泌を行う細胞で、小胞体が非常に発達しており、小胞体ストレスに感受性が高い。すなわち、小胞体ストレス応答における防御機構の破綻が引き起こす細胞死により β 細胞が脱落し、インスリン分泌不全により糖尿病が亢進すると考えられている(非特許文献7)。一方、小胞体ストレスによりHtrA2の発現が亢進することが報告されている。これらから、HtrA2が、糖尿病の新たな標的となる可能性が高く、また小胞体ストレスによる細胞死を阻害することは、新規な創薬標的になると考えられる。

【0007】

本発明の課題は、HtrA2によるカスパーゼ非依存的な細胞死の機構およびHtrA2の基質が未だ明らかになっていない状況において、HtrA2と相互作用する蛋白質を見出し、HtrA2による該蛋白質の分解に基づく疾患の防止および/または治療を可能にする手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、HtrA2がCREBL1と相互作用することをインシリコ(in silico)で予測し、さらに活性型HtrA2(成熟型HtrA2)によりCREBL1およびCREBL1のファミリーであるATF6が分解されることを実験的に証明して本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、

1. CREBL1および/またはATF6のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする細胞死阻害方法、
2. CREBL1および/またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする細胞死阻害方法、
3. 細胞死が膵臓 β 細胞の細胞死である前記1. または2. の細胞死阻害方法、
4. CREBL1および/またはATF6のHtrA2による分解、を阻害することを特徴とする糖尿病の防止方法および/または治療方法、

5. CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、HtrA2によるCREBL1および／またはATF6の分解、を可能にする条件下、CREBL1若しくはATF6および／またはHtrA2を化合物と接触させ、CREBL1またはATF6を検出することができるシグナルおよび／マーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／マーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出することにより、化合物がCREBL1またはATF6の分解を阻害するか否かを決定する方法、

6. CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法であって、HtrA2によるCREBL1および／またはATF6の分解、を可能にする条件下、CREBL1若しくはATF6および／またはHtrA2を化合物と接触させ、CREBL1またはATF6の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、あるいはCREBL1の分解物またはATF6の分解物の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により、化合物がCREBL1またはATF6の分解を阻害するか否かを決定する方法、

7. CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる細胞死阻害剤、

8. 細胞死が膵臓β細胞の細胞死である前記7.の細胞死阻害剤、

9. CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物を少なくとも1つ以上含んでなる糖尿病の防止剤および／または治療剤、

10. HtrA2、HtrA2をコードするポリヌクレオチドおよびHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、CREBL1、ATF6、CREBL1またはATF6をコードするポリヌクレオチド、およびCREBL1またはATF6をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット、
に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明ではHtrA2と相互作用するCREBL1を見出し、さらに活性型HtrA2がCREBL1およびATF6を分解することを初めて明らかにした。CREBL1およびATF6は、小胞体ストレスを感知してシャペロン遺伝子群の転写を誘導し、細胞における小胞体ストレスの回復とその生存に関与すると考えられる。このことから、本発明は、CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、に基づく細胞死の阻害、例えば膵臓β細胞の細胞死の阻害、並びに糖尿病の防止および／または治療のために非常に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「ポリペプチド」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

【0012】

本発明においては、HtrA2とCREBL1が相互作用することを、国際公開WO01/67299号パンフレット記載の方法に従ってインシリコで予測した。さらに実験的に、HtrA2がCREBL1およびATF6を分解することを初めて明らかにした。

【0013】

HtrA2、CREBL1およびATF6はいずれも公知蛋白質であり、ジェンバンク

(GenBank) にそれぞれアクセッション番号 NM_013247、NM_00438 および NM_007348 として開示されている。本実施例においては、HtrA2 として配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなる成熟型 HtrA2 を、CREBL1 および ATF6 として配列番号 16 および 18 にそれぞれ記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いた。本実施例で用いた CREBL1 DNA (配列番号 15) は、アクセッション番号 NM_00438 に開示された塩基配列と比較して塩基の 1 つに相違が認められた (実施例 2 参照)。本実施例で用いた ATF6 DNA (配列番号 17) は、アクセッション番号 NM_007348 に開示された塩基配列と比較して 15 個の塩基に相違が認められた (実施例 2 参照)。

【0014】

CREBL1 は、ATF6 β と称される ATF6 のファミリーであり、小胞体に局在する。CREBL1 は小胞体ストレスにより S1P、S2P によりプロセッシングを受けて一部が核移行し、転写因子として働くことが知られている。

【0015】

CREBL1 および ATF6 はいずれも、小胞体ストレスを感知してシャペロン遺伝子群の転写を誘導することでストレスに対する細胞の回復と生存に寄与することが知られている (非特許文献 8 および 9)。

【0016】

これらから、過剰な小胞体ストレスによって活性化されたあるいは増加した HtrA2 は、CREBL1 および／または ATF6 を分解することで小胞体ストレスを亢進して細胞死を招くと考えられる。したがって、CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害することによりかかる細胞死に基づく疾患の防止および／または治療が可能になる。例えば HtrA2 は、膵臓 β 細胞において小胞体ストレスにより β 細胞の細胞死を招き、その結果インスリン分泌不全を引き起こして糖尿病を亢進させると考えられる。すなわち、CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、の阻害は膵臓 β 細胞の生存につながり、さらには糖尿病の防止および／または治療が可能になる。

【0017】

これらの知見に基づいて、本発明においては、CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、の阻害方法を提供する。さらに、CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、を阻害することの特徴とする細胞死阻害方法、例えば膵臓 β 細胞の細胞死阻害方法、並びに CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、に基づく疾患、例えば糖尿病の防止方法および／または治療方法を提供する。

【0018】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、の阻害は HtrA2 の作用を阻害することにより実施可能である。例えば、CREBL1 または ATF6 と HtrA2 の相互作用を阻害することにより実施できる。あるいは、HtrA2 の酵素活性を阻害することにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する物質 (後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる。) を阻害剤と称する。また、本明細書中で、「CREBL1 または ATF6 と HtrA2 が相互作用する」とは、CREBL1 または ATF6 と HtrA2 がある様式により互いに作用を及ぼし、その結果、具体的には CREBL1 または ATF6 が HtrA2 により分解されることを意味する。前記「ある様式」とは、結合、接触あるいは近接等を含むものであり、結果として互いに作用を及ぼし得る様式であればいずれのものであってもよい。

【0019】

CREBL1 および／または ATF6 の HtrA2 による分解、の阻害は具体的には、CREBL1 または ATF6 と HtrA2 の相互作用を阻害する化合物を用いて実施可能である。かかる化合物として、CREBL1 または ATF6 と HtrA2 が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを例示できる。特に、HtrA2 の基質となる

CREBL1またはATF6由来のかかるポリペプチドは、蛋白質間相互作用を競合的に阻害し、HtrA2によるこれら各蛋白質の分解、を阻害することができる。このようなポリペプチドは、HtrA2、CREBL1またはATF6のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、を阻害するものを選択することにより得ることができる。CREBL1またはATF6のHtrA2により分解される部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、かかるポリペプチドとして好適である。このように特定されたポリペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、さらにCREBL1またはATF6のHtrA2による分解、を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー (Ulmer) の技術 (非特許文献10) を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質 (物性、機能または免疫学的活性等) を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等) の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0020】

上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、成書 (非特許文献11および12) に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、通常液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等を挙げることができる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換えDNA (発現ベクター) を作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造可能である。

【0021】

CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、の阻害は、HtrA2、CREBL1またはATF6を認識する抗体であって、CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する抗体を用いることによって実施可能である。かかる抗体は、HtrA2、CREBL1またはATF6自体、あるいはCREBL1またはATF6とHtrA2が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

【0022】

CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、の阻害は、HtrA2の酵素活性を阻害する化合物、好ましくは特異的に阻害する化合物により実施可能である。かかる化合物は、例えば、CREBL1またはATF6を基質として、HtrA2による当該基質の分解、を阻害するものを同定することにより得ることができる。HtrA2を特異的に阻害するとは、HtrA2を強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

【0023】

CREBL1および/またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。例えば、CREBL1および/またはATF6のHtrA2による分解、を可能にする条件を選択し、当該条件下でCREBL1若しくはATF6および/またはHtrA2を調べようとする化合物 (被検化合物) と接触させ、CREBL1若しくはATF6の分解を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルお

よび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を阻害する化合物を同定できる。CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、CREBL1またはATF6とHtrA2とを共発現させた細胞を用いることもできる。細胞における共発現は、CREBL1またはATF6をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとHtrA2をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的な方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより達成できる。CREBL1若しくはATF6および／またはHtrA2と被検化合物との接触は、CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、の反応以前に行なってもよいし、該分解の反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのものの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、CREBL1またはATF6の分解は、これら蛋白質量またはこれら蛋白質の分解物量の存在若しくは不存在および／または変化の検出により測定できる。これら蛋白質量またはこれら蛋白質の分解物量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロットティング法等を用いて実施できる。

【0024】

本発明において使用するHtrA2、CREBL1またはATF6は、これらを遺伝子工学的な手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、CREBL1またはATF6とHtrAの相互作用、およびこれら蛋白質の機能、例えばHtrA2の蛋白質分解酵素活性やCREBL1またはATF6の酵素基質としての性質等に影響がなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やポリペプチド、例えばβ-ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的な手法等を用いて付加したものであってもよい。

【0025】

被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはHtrA2、CREBL1またはATF6の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、CREBL1またはATF6のHtrA2により分解される部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

【0026】

上記同定方法で得られた化合物は、CREBL1またはATF6のHtrA2による分解、の阻害剤として利用可能である。当該化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

【0027】

上記化合物は、CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、に基づく細胞死、例えば脾臓β細胞の細胞死の阻害剤に利用可能である。好ましくは小胞体ストレスによる細胞死の阻害剤として有用である。

【0028】

上記化合物はさらに、CREBL1および／またはATF6のHtrA2による分解、

に基づく疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に利用可能である。かかる疾患としては、例えば膵臓 β 細胞の細胞死に基づく疾患、より具体的には糖尿病を挙げることができる。

【0029】

本発明に係る疾患の防止剤および／または治療剤は、上記化合物および上記細胞死阻害剤のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。

【0030】

本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

【0031】

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

【0032】

例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

【0033】

所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

【0034】

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

【0035】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。

【0036】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示

できる。

【0037】

キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

【0038】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0039】

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり約 0.01 μ g 乃至 100 mg 程度、好ましくは約 0.1 μ g ~ 1 mg 程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は 1 日 1 ~ 数回に分けて投与することができ、数日または数週間に 1 回の割合で間欠的に投与してもよい。

【0040】

本発明の医薬組成物を投与するときには、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは目的の疾患の防止および／または治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

【0041】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。

【0042】

投与形態としては、各種の形態が目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

【0043】

さらに本発明は、HtrA2、HtrA2 をコードするポリヌクレオチドおよび HtrA2 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つと、CREBL1、ATF6、CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチド、および CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなるキットを提供する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

【0044】

HtrA2、CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチドは、ヒト cDNA ライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。HtrA2、CREBL1 または ATF6 をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターは、当該ポリヌクレオチドを適当な発現 DNA ベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入することにより得られる。

【0045】

上記キットは、CREBL1 または ATF6 の HtrA2 による分解、を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでもよい。製剤化

にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0046】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

【0047】

(H t r A 2と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

H t r A 2と相互作用する機能を有する蛋白質を、国際公開第W O 0 1 / 6 7 2 9 9号パンフレットに記載の予測方法に従って予測した。すなわち、H t r A 2のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とH t r A 2との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをH t r A 2と相互作用すると予測した。

解析の結果、H t r A 2と相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、C R E B L 1を見出した。

【実施例2】

【0048】

(インビトロ プロテアーゼアッセイ)

C R E B L 1またはC R E B L 1のファミリーであるA T F 6とH t r A 2の相互作用を実験的に確認するために、インビトロにおけるプロテアーゼアッセイを実施した。

【0049】

<材料およびその調製>

本実施例においては、活性型H t r A 2および不活性型H t r A 2としてそれぞれ、いずれもC末T a gとしてヒスチジン (H i s) を付加した成熟型H t r A 2 (配列番号4) および成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) (配列番号6) を用いた。また、H t r A 2と相互作用すると予想した蛋白質として、いずれもN末T a gとしてc - M y cを付加したC R E B L 1 (配列番号16) およびA T F 6 (配列番号18) を用いた。

【0050】

1. 成熟型H t r A 2および成熟型H t r A 2 (S 3 0 6 A) のクローニングおよび発現プラスミドの作製

成熟型H t r A 2 [前駆体H t r A 2 (DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列は配列番号1および2に記載) のアミノ酸残基134-458部分] の遺伝子を得るために、Human Kidney QUICK-Clone cDNA (Clontech社) を鋳型とし、H t r A 2-F1プライマー (5'側にNde I部位とA T Gを付加、配列番号19) とH t r A 2-RSプライマー (終止コドンを除いてXho I部位を付加、配列番号20) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plus (Toyobo社) を用いてポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR法) により成熟型H t r A 2遺伝子を増幅し、pCR-B1unt II-TOPOベクター (Invitrogen社) にクローニングした。またシーケンサー (Applied Biosystems/Hitachi: ABI 3100) により塩基配列を確認した。本実施例で得られた成熟型H t r A 2 DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3および4に記載した。成熟型H t r A 2大腸菌発現プラスミドについては、クローニングした成熟型H t r A 2の遺伝子をNde IとXho Iで消化し、pET24bベクター (Novagen社) に組み込むことで得た。

【0051】

成熟型H t r A 2の174番目 [前駆体蛋白質 (配列番号2) では306番目に相当] のセリンをアラニンに置換した変異体は、プロテアーゼの活性が失われることが報告されている。そこで、成熟型H t r A 2発現プラスミドを鋳型とし、H t r A 2-MFプライマー (配列番号21) とH t r A 2-MRプライマー (配列番号22) を用いてQuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit

(Stratagene社)により、上記セリンをアラニンに置換した不活性型である成熟型HtrA2 (S306A) 大腸菌発現プラスミドを作製した。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。本実施例で得られた成熟型HtrA2 (S306A) DNA塩基配列および該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5および6に記載した。

【0052】

2. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A) の発現および精製

成熟型HtrA2大腸菌発現プラスミドを大腸菌BL21 Star (DE3) コンピテントセル (Invitrogen社) に導入した形質転換体を得た。この形質転換体を用いて、26℃の下、100mlのLB培地で培養し、吸光度(OD)が0.68~0.81の時にイソプロピルー1-チオーβ-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度0.1mM添加することにより成熟型HtrA2蛋白質の発現誘導を行い、一晚培養した後、成熟型HtrA2を発現している大腸菌を遠心処理により分離回収した。得られた大腸菌を、リシスバッファーA [Lysis buffer: リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) / 1% トライトンX-100、1μg/ml ペプスタチン、5μM E64] に懸濁し、氷冷下でソニケーター (15秒×10回) により菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心処理し (15,000rpm、30分、4℃)、可溶性画分 (上清) と不溶性画分に分離した。成熟型HtrA2の含まれる可溶性画分を、あらかじめ1% トライトンX-100、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて平衡化したプロボンドレジン (Invitrogen社: 1ml prepacked) に加え、4℃で30分間混和した後、洗浄バッファー [20mM リン酸ナトリウム (pH6.0)、500mM NaCl] にて3回洗浄した。レジジンに吸着した成熟型HtrA2は、50、100、200、350、500mM イミダゾールをそれぞれ含む溶出バッファー [20mM リン酸ナトリウム (pH6.0)、500mM NaCl] にて段階的に溶出した。各溶出液についてSDS-PAGEを行い、成熟型HtrA2を含む画分を特定した。その結果、350~500mM イミダゾールで成熟型HtrA2が溶出された。成熟型HtrA2を含む画分を150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH7.5) に対して透析した後、遠心処理にて不溶物を除去した上清を濃縮し、牛血清アルブミン (BSA) を標準蛋白質としてクマシープラスプロテインアッセイ (Coomassie Plus Protein Assay, Pierce社) により蛋白質を定量した。また成熟型HtrA2 (S306A) の発現および精製についても同様に行った。

【0053】

3. CREBL1およびATF6のクローニングおよび発現プラスミドの作製

CREBL1については、まずHuman Brain cDNAを鋳型とし、83-Fプライマー (ATGの直前にEcoRI部位とGCCを付加、配列番号23) と83-Rプライマー (終止コドンを除いてXhoI部位を付加、配列番号24) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりCREBL1遺伝子を増幅させ、pCMV-Tag5にクローニングした。

【0054】

次に、pCMV-Tag5に組み込んだCREBL1遺伝子を鋳型とし、ATF6-NF1プライマー (ATGを除いてBamHI部位を付加、配列番号25) とATF6-NR1プライマー (終止コドンの後にXhoI部位を付加、配列番号26) およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりCREBL1遺伝子を増幅させ、pCR-BLuntII-TOPOベクターにクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。本実施例で得られたCREBL1 DNA塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM_00438として既に登録されたDNA塩基配列と比較して塩基の1つに相違が認められた (T450C)。この相違によるアミノ酸の変化はなかった。また、終止コドンがTGAからTAAに変化した。これらの相違はPCRエラーではないことを確認した。本実施例で得られたCREBL1 DNA塩基配列および該DNAにコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号15および16に記載した。

。CREBL1動物細胞発現プラスミドについては、クローニングしたCREBL1遺伝子をBamHIとXhoIで消化し、pCMV-Tag3に組み込むことで得た。

【0055】

ATF6については、まず、Mammary Gland QUICK-Clone cDNA (Clontech社)を鋳型とし、ATF6Fnプライマー(配列番号27)とATF6Rnプライマー(配列番号28)およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子を増幅させた。次に、この増幅されたATF6遺伝子を鋳型とし、ATF6F1Lプライマー(ATGの直前にEcoRV siteを付加、配列番号29)とATF6R1Lプライマー(終止コドンの直後にXhoI siteを付加、配列番号30)およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子をさらに増幅させ、pCR4Blunt-TOPOベクター(Invitrogen社)にクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した(配列番号17)。本実施例で得られたATF6 DNA塩基配列は、GenBankにアクセッション番号NM_007348として既に登録されたDNA塩基配列と比較して15個の塩基に相違が認められた。相違する15塩基は全てゲノム配列と一致することが判明した: T105C(アミノ酸の変化なし); T199A(LeuからMetへのアミノ酸の変化を伴う); A201G(LeuからMetへのアミノ酸の変化を伴う); C270T(アミノ酸の変化なし); A309G(アミノ酸の変化なし); C433G(ProからAlaへのアミノ酸の変化を伴う); T469C(SerからProへのアミノ酸の変化を伴う); G1228A(GlyからSerへのアミノ酸の変化を伴う); A1230C(GlyからSerへのアミノ酸の変化を伴う); C1389T(アミノ酸の変化なし); T1416C(アミノ酸の変化なし); T1491A(アミノ酸の変化なし); T1538C(ValからAlaへのアミノ酸の変化を伴う); G1540C(ValからLeuへのアミノ酸の変化を伴う); およびG1896A(アミノ酸の変化なし)。また、全てのアミノ酸の変化に関してSWISS-PROTではコンフリクトで記載がある。本実施例で得られたATF6 DNA塩基配列および該DNAにコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号17および18に記載した。

【0056】

ATF6遺伝子を動物細胞発現ベクターに組み込むために、上記のpCR4Blunt-TOPOベクターにクローニングしたATF6遺伝子を鋳型とし、ATF6F2Lプライマー(ATGの直前にBglII siteを付加、配列番号31)とATF6R1Lプライマー(配列番号30)およびDNAポリメラーゼとしてKOD-plusを用いてPCR法によりATF6遺伝子を増幅し、pCR4Blunt-TOPOベクターにクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した(配列番号19)。このクローニングしたATF6遺伝子をBglIIとXhoIで消化し、BamHIとXhoIで消化した動物細胞発現ベクターであるpCMV-Tag3に組み込んだ。

【0057】

4. CREBL1およびATF6の発現

トランスフェクション前日に細胞数 1.5×10^6 / 10cm ディッシュ(Dish)としたHEK293T細胞に、CREBL1またはATF6の発現プラスミドをFuGene6(Roche)にて導入した($10 \mu\text{g}/\text{Dish}$)。48時間後、細胞をPBSで洗浄し、1mlのリシスバッファーB[50mM Tris-HCl(pH7.6)、150mM NaCl、1% トライトンX-100、1% ノニデットP-40(NP-40)、コンプリートミニ(Complete Mini、EDTA不含)]を添加し氷上で10分間静置した。その後、スクレーパーで細胞を集め、1.5mlのチューブに入れ、氷冷下でソニケーション処理(15秒×6回)を行い、氷中で20分静置後、ピペティングで懸濁し、遠心処理(15,000rpm、30分間、4℃)により可溶性画分と不溶性画分を分離した。検討用試料としては、可溶性画分を用いた。

【0058】

5. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)の活性の検討

カゼインザイモグラフィーおよびカゼインナトリウムのプロテアーゼアッセイにより成熟型 H t r A 2 および成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) の活性の検討を行った。カゼインザイモグラフィーはプロトコール (I n v i t r o g e n 社) に従い、成熟型 H t r A 2 および成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) を非還元下で 2×SDS サンプルバッファーと等量混合し、室温で 10 分静置した後、4~16% ザイモグラム (B l u e c a s e i n) ゲル (Z y m o g r a m G e l, I n v i t r o g e n 社) による分離を行った。泳動終了後、2.5% トライトン X-100 にてリネーチャー (r e n a t u r e) した後、ディベロピングバッファー (D e v e l o p i n g b u f f e r) 中で 37℃、一晩カゼイン分解反応を行った。

【0059】

一方、カゼインナトリウムを基質としたプロテアーゼアッセイについては、反応バッファー [150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.5)] 中で成熟型 H t r A 2 あるいは成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) を 200 μg/ml、カゼインナトリウムを 400 μg/ml の濃度となるように混合し、37℃でインキュベーションした。反応開始 3 時間後および一晩後に反応液の一部を採取して、2×SDS サンプルバッファーと等量混合し煮沸処理後、SDS-PAGE を行い、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によりカゼインナトリウムの分解の有無を確認した。

【0060】

上記検討の結果、成熟型 H t r A 2 によるカゼインの分解が認められたが、成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) ではカゼインの分解が認められなかった。このことから、成熟型 H t r A 2 はプロテアーゼ活性を有する活性型であるが、成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) はプロテアーゼ活性を示さない不活性型であることが確認できた。

【0061】

<方法>

可溶性画分に含まれる夾雑蛋白質の影響を除くために免疫沈降にて樹脂に捕捉した CREBL1 および ATF6 を実験に用いた。CREBL1 および ATF6 の各可溶性画分 300 μl を 6 本のチューブ (No. 1-6) に分注し、各チューブに BSA でブロッキングした 50% スラリーのプロテイン G セファロース 4 FF (Amersham 社) を 20 μl 添加し、4℃で 1 時間転倒混和後、遠心処理 (10,000 rpm、10 秒間、4℃) にて上清を回収し前処理 (p r e - c l e a n) を行った。

【0062】

得られた上清に抗 Myc 抗体 (I n v i t r o g e n 社) を 1.7 μl (2 μg) 添加し、4℃で 3 時間転倒混和後に、BSA でブロッキングしたプロテイン G セファロース 4 FF を 20 μl 添加し 4℃で 1 晩転倒混和し、プロテイン G セファロース 4 FF に CREBL1 および ATF6 を捕捉した。つぎに CREBL1 または ATF6 が捕捉されたプロテイン G セファロース 4 FF を 500 μl の洗浄バッファー [50mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、0.01% トライトン X-100] で 5 回洗浄した後、No. 1 および 2 のチューブには 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、0.01% トライトン X-100 を、No. 3 および 4 のチューブには 50 μg/ml の成熟型 H t r A 2 溶液 100 μl を、No. 5 および 6 のチューブには 50 μg/ml の成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) 溶液 100 μl をそれぞれ加えた。No. 1、3 および 5 のチューブは 37℃で 4 時間、No. 2、4 および 6 のチューブは一晩反応させた後、遠心処理により上清を除去して 500 μl の洗浄バッファーにて 3 回、遠心洗浄を行い、2×SDS サンプルバッファー (β-メルカプトエタノール 0.1% 含む) を 80 μl 加え煮沸処理した。得られた試料 80 μl のうち 10 μl を使用し、SDS-PAGE 後、PVDF 膜へ転写し、ウェスタンブロットにより、成熟型 H t r A 2 および成熟型 H t r A 2 (S 3 0 6 A) による CREBL1 および ATF6 の分解の有無を検出した。1 次抗体としては抗 c-Myc 抗体 (9E10) (S a n t a c r u z 社) を、2 次抗体はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (HRP) 標識した抗マウス IgG 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社) を、検出試

薬としてECL Western Blotting Detection System (Amersham社)を用いた。

【0063】

<結果>

CREBL1およびATF6がいずれも、成熟型HtrA2によってインビトロで分解されることを認めた。また、いずれも成熟型HtrA2 (S306A)では分解されなかった(図1-Aおよび図1-B)。

【実施例3】

【0064】

(細胞内におけるプロテアーゼアッセイ)

CREBL1またはATF6とHtrA2の相互作用を細胞内におけるプロテアーゼアッセイにより検討した。

【0065】

<材料およびその調製>

成熟型HtrA2のN末の4残基(AVPS)は、アポトーシスの阻害に働くIAP (Inhibitor of apoptosis protein)ファミリー蛋白質との結合モチーフであり、IAPsと結合して阻害することによりカスパーゼ依存的な細胞死を促進すると報告されている。この作用は、細胞内でのプロテアーゼアッセイの検討に影響を与える可能性が考えられる。そこで成熟型HtrA2または成熟型HtrA2 (S306A)とIAPsとの相互作用を阻害するために、4残基(AVPS)を欠失させたものまたはアラニンをグリシンに置換(AVPS→GVPS)したものを成熟型HtrA2および成熟型HtrA2 (S306A)についてそれぞれ作製した。これら各種HtrA2はいずれもC末TagとしてFLAGを付加したものをを用いた。

【0066】

1. 各種HtrA2の調製

これら成熟型HtrA2の変異体の作製には、成熟型HtrA2を鋳型とし、センスプライマーとしてF1およびF2プライマー(ATGの直前にSacI siteを付加、それぞれ配列番号32および配列番号33)を、アンチセンスプライマーには、HtrA2-RSプライマー(配列番号20)を用い、またDNAポリメラーゼは、Pfu turbo (STRATAGENE)を用いてPCR法により、成熟型HtrA2(Δ AVPS)および成熟型HtrA2(GVPS)の各遺伝子を増幅させ、pCR-Blunt II-TOPOベクターにクローニングした。またシーケンサーにより塩基配列を確認した。成熟型HtrA2(Δ AVPS)および成熟型HtrA2(GVPS)の動物細胞発現プラスミドについては、クローニングした成熟型HtrA2(Δ AVPS)および成熟型HtrA2(GVPS)の各遺伝子をSacIとXhoIで消化し、pCMV-Tag4に組み込むことで得た。本実施例で得られた成熟型HtrA2(Δ AVPS)および成熟型HtrA2(GVPS)のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号7および9に、該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号8および10に記載した。

【0067】

成熟型HtrA2 (S306A)の変異体についても同様に、成熟型HtrA2 (S306A)を鋳型とし、PCR法により、成熟型HtrA2 (S306A、 Δ AVPS)および成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)の各遺伝子を増幅させ、pCR-Blunt II-TOPOベクターにクローニングした。成熟型HtrA2 (S306A、 Δ AVPS)および成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)の動物細胞発現プラスミドについては、クローニングした成熟型HtrA2 (S306A、 Δ AVPS)および成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)の各遺伝子をSacIとXhoIで消化し、それぞれpCMV-Tag4に組み込むことで得た。本実施例で用いた成熟型HtrA2 (S306A、 Δ AVPS)および成熟型HtrA2 (S306A、GVPS)のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号11および13に、該DNAがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号12および14に記載した。

【0068】

2. 各種HtrA2の酵素活性の検討

培養細胞で発現した各種HtrA2に関して、カゼインナトリウムを基質としたプロテアーゼアッセイにより、その酵素活性を測定した(実施例2参照)。その結果、成熟型HtrA2(Δ AVPS)および成熟型HtrA2(GVPS)はいずれもプロテアーゼ活性を持つ活性型であること、成熟型HtrA2(S306A、 Δ AVPS)および成熟型HtrA2(S306A、GVPS)はいずれもプロテアーゼ活性を持たない不活性型であることを確認した。

【0069】

3. CREBL1およびATF6の動物細胞用発現ベクターの作製

実施例2と同様の方法で作製したものを用いた。

【0070】

<方法>

各種HtrA2発現プラスミドとCREBL1またはATF6の発現プラスミドとは、トランスフェクション前日に細胞数 5×10^5 / 6 cm DishとしたHEK293T細胞にFuGene6を用いて導入した。各種HtrA2発現プラスミドはそれぞれ、CREBL1発現プラスミドまたはATF6発現プラスミドと組合わせて、それぞれ $1 \mu\text{g}$ / Dish添加した。48時間後、各種HtrA2とCREBL1またはATF6とを共発現させた細胞については、 $200 \mu\text{l}$ のリシスバッファーBに $2 \times \text{SDS}$ サンプルバッファー(β -メルカプトエタノール0.1%含む)を等量加え、ソニケーション後、煮沸処理したものを検討用試料とした。

【0071】

上記各検討用試料 $10 \mu\text{l}$ を用いてウエスタンブロットにより、CREBL1およびATF6の発現、および分解の有無を確認した。1次抗体としては抗c-Myc(9E10)抗体を、2次抗体はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)標識した抗マウスIgG抗体を、検出試薬としてECL Western Blotting Detection Systemを用いた。

【0072】

<結果>

細胞内におけるCREBL1およびATF6の分解の有無をそれぞれ図2-Aおよび図2-Bに示した。CREBL1およびATF6はいずれも、活性型の成熟型HtrA2(Δ AVPS)または活性型の成熟型HtrA2(GVPS)により分解された。一方、これらは不活性型の成熟型HtrA2(S306A、 Δ AVPS)または不活性型の成熟型HtrA2(S306A、GVPS)では分解されなかった。

【実施例4】

【0073】

(HtrA2による分解パターンの検討)

HtrA2によるCREBL1の分解パターンを検討した。検討は、ビオチン化したCREBL1を用いて、HtrA2によるインビトロ プロテアーゼアッセイにより行った。

【0074】

<材料およびその調製>

1. 成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)

成熟型HtrA2および成熟型HtrA2(S306A)は、実施例2と同様の方法で調製したものを用いた。

【0075】

2. CREBL1動物細胞発現プラスミド

CREBL1動物細胞発現プラスミドは、pCR-BluntII-TOPOベクターに実施例2と同様の方法でクローニングしたCREBL1をBamHIとXhoIで消化し、pCDNA3.1/Hisに組み込みことで得た。

【0076】

3. インビトロ翻訳反応系を用いたビオチン化CREBL1の調製

ビオチンで標識されたCREBL1の調製は、ウサギ網状赤血球ライセート (rabbit reticulocyte lysate) を用いたインビトロ翻訳反応系 (T_NT登録商標 Transcription/Translation System; Promega社) で行った。

インビトロ翻訳反応溶液 (T_NT登録商標 Quick Master Mix) 40 μ l にCREBL1動物細胞発現プラスミド (1 μ g/ μ l) 1.5 μ l、1mM メチオニン1 μ l、ビオチン化リジンtRNA (Promega社) 1 μ l、ヌクレアーゼを含まない水 (Nuclease free water) 6.5 μ lを加えて全量50 μ lとし、30℃で1.5時間反応させた。その後、反応液50 μ lから12.5 μ lを採取し、2×SDS サンプルバッファーを加え煮沸処理後、ウエスタンブロットにより、ビオチンでラベルされたCREBL1の発現を検出した。検出は、ストレプトアビジン-^{HRP} (Promega社)、TranscendTM Chemiluminescent substrate (TranscendTM Non-Radioactive Translation detection system; Promega社) を用いて行った。その結果、いずれもビオチン化されていることが確認できた。

【0077】

<方法>

上記反応液をプロテアーゼアッセイの試料として用いた。反応液を12.5 μ lずつ3本のチューブ (No2-4) に分注し、No2のチューブはコントロールとして、50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Triton X-100を25 μ l、No3のチューブには200 μ g/mlの成熟型HtrA2溶液を25 μ l、No4のチューブには200 μ g/mlの成熟型HtrA2 (S306A) 溶液25 μ lをそれぞれ加え混合した。各チューブ (No2-4) をさらに半量ずつ分注し、1つのチューブは37℃で4時間反応し、もう一方のチューブは、37℃で一晩反応させた。反応後、各チューブに2×SDS サンプルバッファーを加え煮沸処理後、ウエスタンブロットにより、ビオチン化CREBL1の分解パターンを検出した。

【0078】

分解の検出は、蛋白質内部のビオチン化されたりジン残基を指標にして、ストレプトアビジン-^{HRP}、TranscendTM Chemiluminescent substrateを用いて行った。

【0079】

さらに分解箇所を調べる為、ウエスタンブロットに用いたメンブレンから、ストレプトアビジン-^{HRP}を除去し、CREBL1のN末に付加されたTagに対する抗体で、ビオチン化CREBL1の分解パターンを検出した。抗体は、1次抗体として抗Xpress抗体 (Invitrogen社) を、2次抗体として^{HRP}標識化抗マウスIgG抗体を用いた。分解の検出は、ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham社) により行った。

【0080】

<結果>

蛋白質内部のビオチン化されたりジン残基を指標に、成熟型HtrA2によるCREBL1の分解パターンを検討した結果を図3に、CREBL1のN末端に付加されたTagを指標として、CREBL1の分解パターンを検討した結果を図4に示した。

【0081】

ビオチン化されたりジン残基を指標にした分解パターンの検討において、50kDa付近に分解産物と思われるバンドが検出された (図3)。しかし、抗Tag抗体による分解パターンの検討では、図3で認められた約50kDaのフラグメントだけでなく、その他のフラグメントも全く検出できなかった (図4)。このことから、CREBL1はHtrA2により数箇所分解されたと考えられる。

【0082】

このように、蛋白質内部を標識化して標識物質を検出することにより、H t r A 2による該蛋白質の分解が検出された。このことから、蛋白質のN末端またはC末端に付加したT a gの検出により明らかになったH t r A 2による蛋白質の分解（実施例2および3）は、T a gが切断分離されたことによる見かけ上の分解ではなく、H t r A 2が各蛋白質の内部に作用した結果生じた分解であることが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0083】

本発明は、CREBL1および／またはATF6のH t r A 2による分解、に基づく細胞死の阻害、例えば膵臓β細胞の細胞死の阻害、さらに細胞死に基づく疾患、例えば糖尿病の防止および／または治療のために利用可能であり、医薬分野において非常に有用性が高い。さらにH t r A 2による細胞死、例えば小胞体ストレスによる細胞死の解明等の研究分野にも利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1-A】活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）によってCREBL1がインビトロで分解されたことを説明する図である。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。（実施例2）

【図1-B】活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）によってATF6がインビトロで分解されたことを説明する図である。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A）〕ではATF6の分解が認められなかった。（実施例2）

【図2-A】活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）のN末4アミノ酸残基を欠失させたH t r A 2（ΔAVPS）または活性型H t r A 2のN末のアラニンをグリシンに置換したH t r A 2（GVPS）によって、CREBL1が細胞内で分解されたことを説明する図である（上図）。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A、ΔAVPS）または成熟型H t r A 2（S306A、GVPS）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。下図は細胞内における各H t r A 2の発現を示す。（実施例3）

【図2-B】活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）のN末4アミノ酸残基を欠失させたH t r A 2（ΔAVPS）または活性型H t r A 2のN末のアラニンをグリシンに置換したH t r A 2（GVPS）によって、ATF6が細胞内で分解されたことを説明する図である（上図）。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A、ΔAVPS）または成熟型H t r A 2（S306A、GVPS）〕ではATF6の分解が認められなかった。下図は細胞内における各H t r A 2の発現を示す。（実施例3）

【図3】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたCREBL1を用いてビオチンを検出することにより、活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。（実施例4）

【図4】蛋白質内部のリジン残基がビオチン化されたCREBL1を用いて、CREBL1のN末端に付加されたT a gを検出することにより、活性型H t r A 2（成熟型H t r A 2）によりCREBL1が分解されたことを説明する図である。不活性型H t r A 2〔成熟型H t r A 2（S306A）〕ではCREBL1の分解が認められなかった。（実施例4）

【配列表フリーテキスト】

【0085】

配列番号5：配列番号3と同じ塩基配列であってその520位の塩基がgである塩基配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号6：配列番号4と同じアミノ酸配列であって174番目のアミノ酸残基がA1aに置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 7：配列番号 3 と同じ塩基配列であってその 4 - 1 5 位の塩基を欠失させた塩基配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号 8：配列番号 4 と同じアミノ酸配列であって 2 - 5 番目のアミノ酸残基を欠失させたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 9：配列番号 3 に記載の塩基配列と同じ塩基配列であってその 5 位の塩基が g であるポリヌクレオチド。

配列番号 1 0：配列番号 4 と同じアミノ酸配列であって 2 番目のアミノ酸残基が G l y に置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 1 1：配列番号 5 と同じ塩基配列であってその 4 - 1 5 位の塩基を欠失させた塩基配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号 1 2：配列番号 6 と同じアミノ酸配列であって 2 - 5 番目のアミノ酸残基を欠失させたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 1 3：配列番号 5 に記載の塩基配列と同じ塩基配列であってその 5 位の塩基が g であるポリヌクレオチド。

配列番号 1 4：配列番号 6 と同じアミノ酸配列であって 2 番目のアミノ酸残基が G l y に置換したアミノ酸配列からなるポリペプチド。

配列番号 1 9：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 0：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 1：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 2：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 3：配列番号 1 5 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 4：配列番号 1 5 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 5：配列番号 1 5 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 6：配列番号 1 5 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 7：配列番号 1 7 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 8：配列番号 1 7 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 2 9：配列番号 1 7 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 3 0：配列番号 1 7 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 3 1：配列番号 1 7 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 3 2：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

配列番号 3 3：配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて設計したプライマー用ポリヌクレオチド。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A method for treating diabetes mellitus by inhibiting degradation of CRBL
1 and /or ATF6 caused by HtrA2

<130> NP03-1159

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atggctgcgc cgagggcgagg gcgggggtgca ggctggagcc ttcgggcatg gcgggctttg      60
gggggcattc gctggggggag gagaccccggt ttgacccttg acctccgggc cctgctgacg      120
tcaggaactt ctgacccccg ggcccagatg acttatggga ccccgagtct ctgggcccgg      180
ttgtctgttg gggtcactga accccgagca tgcctgacgt ctgggacccc ggggtccccg      240
gcacaactga ctgcggtgac cccagatacc aggacccggg aggcctcaga gaactctgga      300
acccgttcgc gcgcgtggct ggcggtggcg ctgggcgctg ggggggcagt gctgttgttg      360
ttgtggggcg ggggtcgggg tcctccggcc gtcctcgccg ccgtccctag cccgccgccc      420
gcttctcccc ggagtcagta caacttcacg gcagatgtgg tggagaagac agcacctgcc      480
gtggtctata tcgagatcct ggaccggcac cctttcttgg gccgcgaggt ccctatctcg      540
aacggctcag gattcgtggt ggctgccgat gggctcattg tcaccaacgc ccatgtggtg      600
gctgatcggc gcagagtccg tgtgagactg ctaagcggcg acacgtatga ggccgtggtc      660
acagctgtgg atcccgtggc agacatcgca acgctgagga ttcagactaa ggagcctctc      720
cccacgtgc ctctgggacg ctgagctgat gtccggcaag gggagtttgt tgttgccatg      780
ggaagtccct ttgactgca gaacacgacg acatccggca ttgttagctc tgctcagcgt      840
ccagccagag acctgggact ccccaaacc aatgtggaat acattcaaac tgatgcagct      900
```

attgattttg gaaactctgg aggtcccctg gttaacctgg atggggaggt gattggagt 960
 aacaccatga aggtcacagc tggaatctcc ttgccatcc cttctgatcg tcttcgagag 1020
 tttctgcatc gtggggaaaa gaagaattcc tcctccgaa tcagtgggtc ccagcggcgc 1080
 tacattgggg tgatgatgct gaccctgagt cccagcatcc ttgctgaact acagcttcga 1140
 gaaccaagct ttcccgatgt tcagcatggt gtactcatcc ataaagtcac cctgggctcc 1200
 cctgcacacc gggctgggtc gcggcctggt gatgtgattt tggccattgg ggagcagatg 1260
 gtacaaaatg ctgaagatgt ttatgaagct gttcgaaccc aatcccagtt ggcagtgcag 1320
 atccggcggg gacgagaaac actgacctta tatgtgaccc ctgaggtcac agaatga 1377

<210> 2
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Pro Arg Ala Gly Arg Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Ala
 1 5 10 15

Trp Arg Ala Leu Gly Gly Ile Arg Trp Gly Arg Arg Pro Arg Leu Thr
 20 25 30

Pro Asp Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ser Gly Thr Ser Asp Pro Arg Ala
 35 40 45

Arg Val Thr Tyr Gly Thr Pro Ser Leu Trp Ala Arg Leu Ser Val Gly
 50 55 60

Val Thr Glu Pro Arg Ala Cys Leu Thr Ser Gly Thr Pro Gly Pro Arg
 65 70 75 80

Ala Gln Leu Thr Ala Val Thr Pro Asp Thr Arg Thr Arg Glu Ala Ser
 85 90 95

Glu Asn Ser Gly Thr Arg Ser Arg Ala Trp Leu Ala Val Ala Leu Gly

100

105

110

Ala Gly Gly Ala Val Leu Leu Leu Trp Gly Gly Gly Arg Gly Pro
115 120 125

Pro Ala Val Leu Ala Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg
130 135 140

Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala
145 150 155 160

Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu
165 170 175

Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val
195 200 205

Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp
210 215 220

Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu
225 230 235 240

Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe
245 250 255

Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser
260 265 270

Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro
275 280 285

Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly
290 295 300

Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val
305 310 315 320

Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp
325 330 335

Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser
340 345 350

Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr
355 360 365

Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe
370 375 380

Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser
385 390 395 400

Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile
405 410 415

Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg
420 425 430

Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu
435 440 445

Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val Thr Glu
450 455

<210> 3

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggccgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcat 60

gtgggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120

ttgggccgag aggtccctat ctcgaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180
 attgtcacca acgcccattgt ggtggctgat cggcgagag tccgtgtgag actgctaagc 240
 ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300
 aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360
 caaggggagt ttgttgttc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420
 ggcatgttta gctctgctca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480
 gaatacattc aaactgatgc agctattgat tttggaaact ctggaggtcc cctgggttaac 540
 ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggcca cagctggaat ctcctttgcc 600
 atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660
 ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720
 atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc 780
 atccataaag tcacctctgg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840
 attttggcca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900
 acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg 960
 acccctgagg tcacagaatg a 981

<210> 4

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile
 20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser
 35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn
50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln

245

250

255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln
290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val
305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu
325

<210> 5
<211> 981
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:
3 wherein the nucleotide of position 520 is g

<400> 5
atggccgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcagat 60
gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120
ttgggccgcg aggtccctat ctcgaacggc tcaggattcg tgggtggctgc cgatgggctc 180
attgtcacca acgcccattgt ggtggctgat cggcgcagag tccgtgtgag actgctaagc 240
ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300
aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360
caaggggagt ttgttgttc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420
ggcattgtta gctctgctca gcgtccagcc agagacctgg gactcccca aaccaatgtg 480
gaatacatc aaactgatgc agctattgat ttgggaaacg ctggagggtcc cctgggttaac 540

```

ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggtca cagctggaat ctcctttgcc      600
atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc      660
ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc      720
atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc      780
atccataaag tcatcctggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tggtgatgtg      840
atcttgccca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga      900
acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg      960
acccctgagg tcacagaatg a                                              981

```

<210> 6
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:4 wherein the 174th amino acid residue is replaced by Ala

<400> 6

```

Met Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn
1           5           10           15

```

```

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile
          20           25           30

```

```

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser
          35           40           45

```

```

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn
          50           55           60

```

```

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser
65           70           75           80

```

```

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp

```

85

90

95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln
245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln
 290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu
 325

<210> 7

<211> 969

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:
 3 wherein the nucleotides of position 4-15 are deleted

<400> 7

```

atgccgccgc ccgtttctcc ccggagtcag tacaacttca tcgcagatgt ggtggagaag      60
acagcacctg ccgtgggtcta tatcgagatc ctggaccggc accctttctt gggccgcgag      120
gtccctatct cgaacggctc aggattcgtg gtggctgccg atgggctcat tgtcaccaac      180
gcccatgtgg tggctgatcg gcgcagagtc cgtgtgagac tgctaagcgg cgacacgtat      240
gaggccgtgg tcacagctgt ggatcccgtg gcagacatcg caacgctgag gattcagact      300
aaggagcctc tccccacgct gcctctggga cgctcagctg atgtccggca aggggagttt      360
gttggttgcca tgggaagtcc ctttgactg cagaacacga tcacatccgg cattgttagc      420
tctgctcagc gtccagccag agacctggga ctccccaaa ccaatgtgga atacattcaa      480
actgatgcag ctattgattt tggaaactct ggagggtccc tggttaacct ggatggggag      540
gtgattggag tgaacaccat gaaggtcaca gctggaatct ctttgccat cccttctgat      600
cgtcttcgag agtttctgca tcgtggggaa aagaagaatt cctcctccgg aatcagtggg      660
tcccagcggc gctacattgg ggtgatgatg ctgacctga gtcccagcat ccttgctgaa      720
ctacagcttc gagaaccaag ctttcccgat gttcagcatg gtgtactcat ccataaagtc      780
atcctgggct cccctgcaca ccgggctggg ctgcccctg gtgatgtgat ttggccatt      840

```

ggggagcaga tggtacaaaa tgctgaagat gtttatgaag ctgttcgaac ccaatcccag 900
ttggcagtgc agatccggcg gggacgagaa acaactgacct tatatgtgac ccctgaggtc 960
acagaatga 969

<210> 8
<211> 322
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID
NO:4 wherein the amino acid residues from the 2nd to the 5th are
deleted

<400> 8

Met Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp
1 5 10 15

Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp
20 25 30

Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly
35 40 45

Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val
50 55 60

Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu
85 90 95

Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser
100 105 110

Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe
115 120 125

Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg
130 135 140

Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln
145 150 155 160

Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn
165 170 175

Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly
180 185 190

Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg
195 200 205

Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg
210 215 220

Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu
225 230 235 240

Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu
245 250 255

Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg
260 265 270

Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala
275 280 285

Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln
290 295 300

Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val
305 310 315 320

Thr Glu

<210> 9
<211> 981
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:
3 wherein the nucleotide of position 5 is g

<400> 9

```
atgggcgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcat 60
gtggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120
ttgggccgag aggtccctat ctggaacggc tcaggattcg tggaggctgc cgatgggctc 180
attgtcacca acgcccattg ggtggctgat cggcgagag tccgtgtgag actgctaagc 240
ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300
aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360
caaggggagt ttgttgttgc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420
ggcattgtta gctctgtca gcgtccagcc agagacctgg gactcccca aaccaatgtg 480
gaatacattc aaactgatgc agctattgat tttggaaact ctggagggtc cctggttaac 540
ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggta cagctggaat ctcttttggc 600
atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660
ggaatcagtg ggtcccagcg gcgtacatt ggggtgatga tgctgaccct gactccagc 720
atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgactc 780
atccataaag tcaccttggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840
atcttgccca ttggggagca gatggtacaa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900
acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggacgag aaacactgac cttatatgtg 960
accctgagg tcacagaatg a 981
```

<210> 10

<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:4 wherein the 2nd amino acid residue is replace by Gly

<400> 10

Met Gly Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn
1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile
20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser
35 40 45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn
50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp
85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met
115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser
130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val
145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly
165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys
180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu
195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly
210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser
225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln
245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg
260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met
275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln
290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val
305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu
325

<210> 11

<211> 969

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO: 5 wherein the nucleotides of position 4-15 are deleted

<400> 11

```
atgccgccgc ccgcttctcc ccggagtcag tacaacttca tcgcagatgt ggtggagaag      60
acagcacctg ccgtgggtcta tatcgagatc ctggaccggc accctttctt gggccgcgag      120
gtccctatct cgaacggctc aggattcgtg gtggctgccg atgggctcat tgcaccaac      180
gccccatgtg tggctgatcg gcgcagagtc cgtgtgagac tgctaagcgg cgacacgtat      240
gaggccgtgg tcacagctgt ggatcccgtg gcagacatcg caacgctgag gattcagact      300
aaggagcctc tccccacgct gcctctggga cgctcagctg atgtccggca aggggagttt      360
gttggtgcca tgggaagtcc ctttgactg cagaacacga tcacatccgg cattgttagc      420
tctgctcagc gtccagccag agacctggga ctccccaaa ccaatgtgga atacattcaa      480
actgatgcag ctattgattt tggaaacgct ggaggtcccc tggttaacct ggatggggag      540
gtgattggag tgaacaccat gaaggtcaca gctggaatct cctttgccat cccttctgat      600
cgtcttcgag agtttctgca tcgtggggaa aagaagaatt cctcctccgg aatcagtggg      660
tcccagcggc gctacattgg ggtgatgatg ctgaccctga gtcccagcat ccttgctgaa      720
ctacagcttc gagaaccaag ctttcccgat gttcagcatg gtgtactcat ccataaagtc      780
atcctgggct cccctgcaca ccgggctggg ctgcggcctg gtgatgtgat tttggccatt      840
ggggagcaga tgggtacaaa tgctgaagat gtttatgaag ctgttcgaac ccaatcccag      900
ttggcagtgc agatccggcg gggacgagaa aactgacct tatatgtgac ccctgaggtc      960
acagaatga                                         969
```

<210> 12

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:6 wherein the amino acid residues from the 2nd to the 5th are deleted

<400> 12

Met Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp
1 5 10 15

Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp
20 25 30

Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly
35 40 45

Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val
50 55 60

Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu
85 90 95

Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser
100 105 110

Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe
115 120 125

Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg
130 135 140

Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln
145 150 155 160

Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly Pro Leu Val Asn
165 170 175

Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly
180 185 190

Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg

195

200

205

Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg
 210 215 220

Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu
 245 250 255

Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg
 260 265 270

Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala
 275 280 285

Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln
 290 295 300

Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val
 305 310 315 320

Thr Glu

<210> 13

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide consisting of the same base sequence of SEQ ID NO:
 5 wherein the nucleotide of position 5 is g

<400> 13

atgggcgtcc ctagcccgcc gcccgcttct ccccgagtc agtacaactt catcgcat 60

tggtggaga agacagcacc tgccgtggtc tatatcgaga tcctggaccg gcaccctttc 120

ttgggccgag aggtccctat ctggaacggc tcaggattcg tggtggctgc cgatgggctc 180

attgtcacca acgcccattgt ggtggctgat cggcgagag tccgtgtgag actgctaagc 240
 ggcgacacgt atgaggccgt ggtcacagct gtggatcccg tggcagacat cgcaacgctg 300
 aggattcaga ctaaggagcc tctccccacg ctgcctctgg gacgctcagc tgatgtccgg 360
 caaggggagt ttgttgttgc catgggaagt ccctttgcac tgcagaacac gatcacatcc 420
 ggcatgttta gctctgctca gcgtccagcc agagacctgg gactccccca aaccaatgtg 480
 gaatacattc aaactgatgc agctattgat tttggaaacg ctggaggtcc cctggttaac 540
 ctggatgggg aggtgattgg agtgaacacc atgaaggatca cagctggaat ctcctttgcc 600
 atcccttctg atcgtcttcg agagtttctg catcgtgggg aaaagaagaa ttcctcctcc 660
 ggaatcagtg ggtcccagcg gcgctacatt ggggtgatga tgctgaccct gagtcccagc 720
 atccttgctg aactacagct tcgagaacca agctttcccg atgttcagca tgggtgtactc 780
 atccataaag tcctcctggg ctcccctgca caccgggctg gtctgcggcc tgggtgatgtg 840
 attttgcca ttggggagca gatgttataa aatgctgaag atgtttatga agctgttcga 900
 acccaatccc agttggcagt gcagatccgg cggggagcag aaacactgac cttatatgtg 960
 acccctgagg tcacagaatg a 981

<210> 14

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polypeptide consisting of the same amino acid sequence of SEQ ID NO:6 wherein the 2nd amino acid residue is replaced by Gly

<400> 14

Met Gly Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile
 20 25 30

Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser

35

40

45

Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn
 50 55 60

Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80

Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp
 85 90 95

Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro
 100 105 110

Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met
 115 120 125

Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val
 145 150 155 160

Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ala Gly Gly
 165 170 175

Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys
 180 185 190

Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu
 195 200 205

Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly
 210 215 220

Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser
 225 230 235 240

Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln
 245 250 255

His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg
 260 265 270

Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met
 275 280 285

Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln
 290 295 300

Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Val Thr Glu
 325

<210> 15

<211> 2112

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggcggagc tgatgctgct cagcgagatt gctgaccga cgcgtttctt caccgacaac 60

ctgcttagcc cggaggactg gggctctgcag aacagcacct tgtattctgg cctagatgaa 120

gtggccgagg agcagacgca gctcttccgt tgcccggagc aggatgtccc gtttgacggc 180

agctccctgg acgtggggat ggatgtcagc ccctctgagc ccccatggga actcctgccg 240

atcttcccag atcttcaggt gaagtctgag ccattctccc cctgctcttc ctccctcctc 300

agctccgagt catcgcgtct ctccacagag ccatccagcg aggctcttgg ggtaggggag 360

gtgctccatg tgaagacaga gtccttggca cccccactgt gtctcctggg agatgacca 420

acatcctcat ttgaaaccgt ccagatcaat gttatcccca cctctgatga ttcctcagat 480

gtccagacca agatagaacc tgtctctcca tgttcttccg tcaactctga ggcctccctg 540

ctctcagccg actcctccag ccaggctttt ataggagagg aggtcctgga agtgaagaca 600

gagtcctgt ccccttcagg atgcctcctg tgggatgtcc cagccccctc acttggagct 660
gtccagatca gcatgggccc atcccttgat ggctcctcag gcaaagccct gccacccgg 720
aagccgccac tgcagcccaa acctgtagtg ctaaccactg tccaatgcc atccagagct 780
gtgcctccca gcaccacagt ccttctgcag tccctcgtcc agccaccccc agtgtcccca 840
gttgtcctca tccaggggtgc tattcgagtc cagcctgaag ggccggctcc ctctctacca 900
cggcctgaga ggaagagcat cgttcccgtc cctatgcctg gaaactcctg cccgcctgaa 960
gtggatgcaa agctgctgaa gcggcagcag cgaatgatca agaaccggga gtcagcctgc 1020
cagtcccgga gaaagaagaa agagtatctg cagggactgg aggctcggct gcaagcagta 1080
ctggctgaca accagcagct ccgccgagag aatgctgccc tccggcggcg gctggaggcc 1140
ctgctggctg aaaacagcga gctcaagtta gggctctggaa acaggaaggt ggtctgcatc 1200
atggctttcc ttctcttcat tgccttcaac tttggacctg tcagcatcag tgagcctcct 1260
tcagctccca tctctcctcg gatgaacaag ggggagcctc aaccccggag acatttgctg 1320
gggttctcag agcaagagcc agttcaggga gttgaacctc tccaggggtc ctcccagggc 1380
cctaaggagc cccagcccag cccacagac cagcccagtt tcagcaacct gacagccttc 1440
cctggggggcg ccaaggagct actactaaga gacctagacc agctcttcct ctctctgat 1500
tgccggcact tcaaccgcac tgagtccttg aggcttgctg acgagttgag tggctgggtc 1560
cagcgccacc agagaggccg gaggaagatc cctcagaggg cccaggagag acagaagtct 1620
cagccacgga agaagtcacc tccagttaag gcagtccca tccaaccccc tggaccccca 1680
gaaagggatt ctgtgggcca gctgcaacta tatcgccacc cagaccgttc gcagccagca 1740
ttcttggatg caattgaccg acgggaagac acattttatg ttgtctcttt ccgaagggac 1800
cacctgctgc tcccagccat cagccacaac aagacctccc ggcccaagat gtccctgggtg 1860
atgcctgcca tggcccccaa tgagaccctg tcaggccgtg gggccccggg ggactatgag 1920
gagatgatgc agatcgagtg tgaggtcagt gacaccaggg tgattcacat caagacctcc 1980
acagtgcccc cctcgtccg aaaacagcca tcccaaccc caggcaatgc cacagggtgc 2040
cccttgccag tctctgcagc cagccaggcc caccaggcct cccaccagcc cctctacctc 2100

aatcatccct aa

2112

<210> 16

<211> 703

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Glu Leu Met Leu Leu Ser Glu Ile Ala Asp Pro Thr Arg Phe
1 5 10 15

Phe Thr Asp Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Trp Gly Leu Gln Asn Ser
20 25 30

Thr Leu Tyr Ser Gly Leu Asp Glu Val Ala Glu Glu Gln Thr Gln Leu
35 40 45

Phe Arg Cys Pro Glu Gln Asp Val Pro Phe Asp Gly Ser Ser Leu Asp
50 55 60

Val Gly Met Asp Val Ser Pro Ser Glu Pro Pro Trp Glu Leu Leu Pro
65 70 75 80

Ile Phe Pro Asp Leu Gln Val Lys Ser Glu Pro Ser Ser Pro Cys Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Arg Leu Ser Thr Glu Pro Ser
100 105 110

Ser Glu Ala Leu Gly Val Gly Glu Val Leu His Val Lys Thr Glu Ser
115 120 125

Leu Ala Pro Pro Leu Cys Leu Leu Gly Asp Asp Pro Thr Ser Ser Phe
130 135 140

Glu Thr Val Gln Ile Asn Val Ile Pro Thr Ser Asp Asp Ser Ser Asp
145 150 155 160

Val Gln Thr Lys Ile Glu Pro Val Ser Pro Cys Ser Ser Val Asn Ser
165 170 175

Glu Ala Ser Leu Leu Ser Ala Asp Ser Ser Ser Gln Ala Phe Ile Gly
180 185 190

Glu Glu Val Leu Glu Val Lys Thr Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Cys
195 200 205

Leu Leu Trp Asp Val Pro Ala Pro Ser Leu Gly Ala Val Gln Ile Ser
210 215 220

Met Gly Pro Ser Leu Asp Gly Ser Ser Gly Lys Ala Leu Pro Thr Arg
225 230 235 240

Lys Pro Pro Leu Gln Pro Lys Pro Val Val Leu Thr Thr Val Pro Met
245 250 255

Pro Ser Arg Ala Val Pro Pro Ser Thr Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu
260 265 270

Val Gln Pro Pro Pro Val Ser Pro Val Val Leu Ile Gln Gly Ala Ile
275 280 285

Arg Val Gln Pro Glu Gly Pro Ala Pro Ser Leu Pro Arg Pro Glu Arg
290 295 300

Lys Ser Ile Val Pro Ala Pro Met Pro Gly Asn Ser Cys Pro Pro Glu
305 310 315 320

Val Asp Ala Lys Leu Leu Lys Arg Gln Gln Arg Met Ile Lys Asn Arg
325 330 335

Glu Ser Ala Cys Gln Ser Arg Arg Lys Lys Lys Glu Tyr Leu Gln Gly
340 345 350

Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ala Val Leu Ala Asp Asn Gln Gln Leu Arg

355

360

365

Arg Glu Asn Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Ala Leu Leu Ala Glu
370 375 380

Asn Ser Glu Leu Lys Leu Gly Ser Gly Asn Arg Lys Val Val Cys Ile
385 390 395 400

Met Val Phe Leu Leu Phe Ile Ala Phe Asn Phe Gly Pro Val Ser Ile
405 410 415

Ser Glu Pro Pro Ser Ala Pro Ile Ser Pro Arg Met Asn Lys Gly Glu
420 425 430

Pro Gln Pro Arg Arg His Leu Leu Gly Phe Ser Glu Gln Glu Pro Val
435 440 445

Gln Gly Val Glu Pro Leu Gln Gly Ser Ser Gln Gly Pro Lys Glu Pro
450 455 460

Gln Pro Ser Pro Thr Asp Gln Pro Ser Phe Ser Asn Leu Thr Ala Phe
465 470 475 480

Pro Gly Gly Ala Lys Glu Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asp Gln Leu Phe
485 490 495

Leu Ser Ser Asp Cys Arg His Phe Asn Arg Thr Glu Ser Leu Arg Leu
500 505 510

Ala Asp Glu Leu Ser Gly Trp Val Gln Arg His Gln Arg Gly Arg Arg
515 520 525

Lys Ile Pro Gln Arg Ala Gln Glu Arg Gln Lys Ser Gln Pro Arg Lys
530 535 540

Lys Ser Pro Pro Val Lys Ala Val Pro Ile Gln Pro Pro Gly Pro Pro
545 550 555 560

Glu Arg Asp Ser Val Gly Gln Leu Gln Leu Tyr Arg His Pro Asp Arg
565 570 575

Ser Gln Pro Ala Phe Leu Asp Ala Ile Asp Arg Arg Glu Asp Thr Phe
580 585 590

Tyr Val Val Ser Phe Arg Arg Asp His Leu Leu Leu Pro Ala Ile Ser
595 600 605

His Asn Lys Thr Ser Arg Pro Lys Met Ser Leu Val Met Pro Ala Met
610 615 620

Ala Pro Asn Glu Thr Leu Ser Gly Arg Gly Ala Pro Gly Asp Tyr Glu
625 630 635 640

Glu Met Met Gln Ile Glu Cys Glu Val Met Asp Thr Arg Val Ile His
645 650 655

Ile Lys Thr Ser Thr Val Pro Pro Ser Leu Arg Lys Gln Pro Ser Pro
660 665 670

Thr Pro Gly Asn Ala Thr Gly Gly Pro Leu Pro Val Ser Ala Ala Ser
675 680 685

Gln Ala His Gln Ala Ser His Gln Pro Leu Tyr Leu Asn His Pro
690 695 700

<210> 17

<211> 2013

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgggggagc cggctggggt tgccggcacc atggagtcac cttttagccc gggactcttt 60

cacaggctgg atgaagattg ggattctgct ctctttgctg aactcgggta tttcacagac 120

actgatgagc tgcaattgga agcagcaaag gagacgtatg aaaacaattt tgataatctt 180

gatttttgatt tggatttgat gccttgggag tcagacattt gggacatcaa caaccaaattc 240

tgtacagtta aagatattaa ggcagaacct cagccacttt ctccagcctc ctcaagttat 300
tcagtctcgt ctccctcggtc agtggactct tattcttcaa ctacagcatgt tcctgaggag 360
ttggatttgt cttctagttc tcagatgtct cccctttcct tatatggtga aaactctaata 420
agtctctctt cagcggagcc actgaaggaa gataagcctg tcaactggtcc taggaacaag 480
actgaaaatg gactgactcc aaagaaaaaa attcaggtga attcaaaacc ttcaattcag 540
cccaagcctt tattgcttcc agcagcaccc aagactcaaa caaactccag tggtccagca 600
aaaaccatca ttattcagac agtaccaacg cttatgccat tggcaaagca gcaaccaatt 660
atcagtttac aacctgcacc cactaaaggc cagacggttt tgctgtctca gcctactgtg 720
gtacaacttc aagcacctgg agttctgccc tctgctcagc cagtccttgc tgttgctggg 780
ggagtcacac agctccctaa tcacgtggtg aatgtggtac cagccccttc agcgaatagc 840
ccagtgaatg gaaaactttc cgtgactaaa cctgtcctac aaagtaccat gagaaatgtc 900
ggttcagata ttgctgtgct aaggagacag caacgtatga taaaaaatcg agaatccgct 960
tgtcagtctc gcaagaagaa gaaagaatat atgctagggt tagaggcgag attaaaggct 1020
gccctctcag aaaacgagca actgaagaaa gaaaatggaa cactgaagcg gcagctggat 1080
gaagtgtgt cagagaacca gaggttaaa gtccctagtc caaagcgaag agttgtctgt 1140
gtgatgatag tattggcatt tataatactg aactatggac ctatgagcat gttggaacag 1200
gattccagga gaatgaaccc tagtgtgagc cctgcaaatac aaaggaggca ctttctagga 1260
ttttctgcta aagaggcaca ggacacatca gatggtatta tccagaaaaa cagctacaga 1320
tatgatcatt ctgtttcaaa tgacaaagcc ctgatggtgc taactgaaga accattgctt 1380
tacattcctc cacctccttg tcagccccta attaacacaa cagagtctct caggttaaat 1440
catgaacttc gaggatgggt tcatagacat gaagtagaaa ggaccaagtc aagaagaatg 1500
acaaataatc aacagaaaac ccgtattctt cagggtgctc tggaacaggg ctcaaattct 1560
cagctgatgg ctgttcaata cacagaaacc actagtagta tcagcaggaa ctcaggaggt 1620
gagctacaag tgtattatgc ttcaccaga agttatcaag acttttttga agccatccgc 1680
agaaggggag acacatttta tgttgtgtca tttcgaaggg atcacctgct gttaccagct 1740

accacccata acaagaccac aagaccaaaa atgtcaattg tgttaccagc aataaacata 1800
aatgagaatg tgatcaatgg gcaggactac gaagtgatga tgcagattga ctgtcaggtg 1860
atggacacca ggatcctcca tatcaaaagt tcgtcagttc ctccttacct ccgagatcag 1920
cagaggaatc aaaccaacac cttctttggc tcccctcccg cagccacaga ggcaaccac 1980
gtgtcagca ccatccctga gtcattacaa tag 2013

<210> 18
<211> 670
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly Glu Pro Ala Gly Val Ala Gly Thr Met Glu Ser Pro Phe Ser
1 5 10 15

Pro Gly Leu Phe His Arg Leu Asp Glu Asp Trp Asp Ser Ala Leu Phe
20 25 30

Ala Glu Leu Gly Tyr Phe Thr Asp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Glu Ala
35 40 45

Ala Asn Glu Thr Tyr Glu Asn Asn Phe Asp Asn Leu Asp Phe Asp Leu
50 55 60

Asp Leu Met Pro Trp Glu Ser Asp Ile Trp Asp Ile Asn Asn Gln Ile
65 70 75 80

Cys Thr Val Lys Asp Ile Lys Ala Glu Pro Gln Pro Leu Ser Pro Ala
85 90 95

Ser Ser Ser Tyr Ser Val Ser Ser Pro Arg Ser Val Asp Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Thr Gln His Val Pro Glu Glu Leu Asp Leu Ser Ser Ser Gln
115 120 125

Met Ser Pro Leu Ser Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Ser Leu Ser Ser
130 135 140

Ala Glu Pro Leu Lys Glu Asp Lys Pro Val Thr Gly Pro Arg Asn Lys
145 150 155 160

Thr Glu Asn Gly Leu Thr Pro Lys Lys Lys Ile Gln Val Asn Ser Lys
165 170 175

Pro Ser Ile Gln Pro Lys Pro Leu Leu Leu Pro Ala Ala Pro Lys Thr
180 185 190

Gln Thr Asn Ser Ser Val Pro Ala Lys Thr Ile Ile Ile Gln Thr Val
195 200 205

Pro Thr Leu Met Pro Leu Ala Lys Gln Gln Pro Ile Ile Ser Leu Gln
210 215 220

Pro Ala Pro Thr Lys Gly Gln Thr Val Leu Leu Ser Gln Pro Thr Val
225 230 235 240

Val Gln Leu Gln Ala Pro Gly Val Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Leu
245 250 255

Ala Val Ala Gly Gly Val Thr Gln Leu Pro Asn His Val Val Asn Val
260 265 270

Val Pro Ala Pro Ser Ala Asn Ser Pro Val Asn Gly Lys Leu Ser Val
275 280 285

Thr Lys Pro Val Leu Gln Ser Thr Met Arg Asn Val Gly Ser Asp Ile
290 295 300

Ala Val Leu Arg Arg Gln Gln Arg Met Ile Lys Asn Arg Glu Ser Ala
305 310 315 320

Cys Gln Ser Arg Lys Lys Lys Lys Glu Tyr Met Leu Gly Leu Glu Ala

325

330

335

Arg Leu Lys Ala Ala Leu Ser Glu Asn Glu Gln Leu Lys Lys Glu Asn
340 345 350

Gly Thr Leu Lys Arg Gln Leu Asp Glu Val Val Ser Glu Asn Gln Arg
355 360 365

Leu Lys Val Pro Ser Pro Lys Arg Arg Val Val Cys Val Met Ile Val
370 375 380

Leu Ala Phe Ile Ile Leu Asn Tyr Gly Pro Met Ser Met Leu Glu Gln
385 390 395 400

Asp Ser Arg Arg Met Asn Pro Ser Val Ser Pro Ala Asn Gln Arg Arg
405 410 415

His Leu Leu Gly Phe Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Thr Ser Asp Gly
420 425 430

Ile Ile Gln Lys Asn Ser Tyr Arg Tyr Asp His Ser Val Ser Asn Asp
435 440 445

Lys Ala Leu Met Val Leu Thr Glu Glu Pro Leu Leu Tyr Ile Pro Pro
450 455 460

Pro Pro Cys Gln Pro Leu Ile Asn Thr Thr Glu Ser Leu Arg Leu Asn
465 470 475 480

His Glu Leu Arg Gly Trp Val His Arg His Glu Val Glu Arg Thr Lys
485 490 495

Ser Arg Arg Met Thr Asn Asn Gln Gln Lys Thr Arg Ile Leu Gln Gly
500 505 510

Ala Leu Glu Gln Gly Ser Asn Ser Gln Leu Met Ala Val Gln Tyr Thr
515 520 525

Glu Thr Thr Ser Ser Ile Ser Arg Asn Ser Gly Ser Glu Leu Gln Val
530 535 540

Tyr Tyr Ala Ser Pro Arg Ser Tyr Gln Asp Phe Phe Glu Ala Ile Arg
545 550 555 560

Arg Arg Gly Asp Thr Phe Tyr Val Val Ser Phe Arg Arg Asp His Leu
565 570 575

Leu Leu Pro Ala Thr Thr His Asn Lys Thr Thr Arg Pro Lys Met Ser
580 585 590

Ile Val Leu Pro Ala Ile Asn Ile Asn Glu Asn Val Ile Asn Gly Gln
595 600 605

Asp Tyr Glu Val Met Met Gln Ile Asp Cys Gln Val Met Asp Thr Arg
610 615 620

Ile Leu His Ile Lys Ser Ser Ser Val Pro Pro Tyr Leu Arg Asp Gln
625 630 635 640

Gln Arg Asn Gln Thr Asn Thr Phe Phe Gly Ser Pro Pro Ala Ala Thr
645 650 655

Glu Ala Thr His Val Val Ser Thr Ile Pro Glu Ser Leu Gln
660 665 670

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

<400> 19

catatggccg tccctagccc gccgcccgt tctccc

36

<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

<400> 20
ctcgagttct gtgacctcag gggtcacata taagg 35

<210> 21
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

<400> 21
gctattgatt ttggaaacgc tggagggtccc ctggttaacc 40

<210> 22
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

<400> 22
ggttaaccag gggacctcca gcgtttccaa aatcaatagc 40

<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
5 for use as a primer

<400> 23
gcgaattcgc catggcggag ctgatgc 27

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
5 for use as a primer

<400> 24

gcctcgaggg gatgattgag gtagaggg

28

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
5 for use as a primer

<400> 25

gcggatcccg cggagctgat gctgctcagc

30

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
5 for use as a primer

<400> 26

cctcgagggtt tagggatgat tgaggtagag ggg

33

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
7 for use as a primer

<400> 27
agttccaggg aaaaggaact tgtgaaatgg 30

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
7 for use as a primer

<400> 28
acgctcagtt ttccacatag ctgcgggtgc 30

<210> 29
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
7 for use as a primer

<400> 29
aaagatatca tgggggagcc ggctgggggtt gccggcacc 39

<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1
7 for use as a primer

<400> 30
aaactcgagc tattgtaatg actcagggat ggtgctgac 39

<210> 31
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:1

7 for use as a primer

<400> 31
aaaagatcta tgggggagcc ggctgggggtt gccggcacc 39

<210> 32
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

<400> 32
gagctcatgc cgccgcccgc ttctccccgg agtcag 36

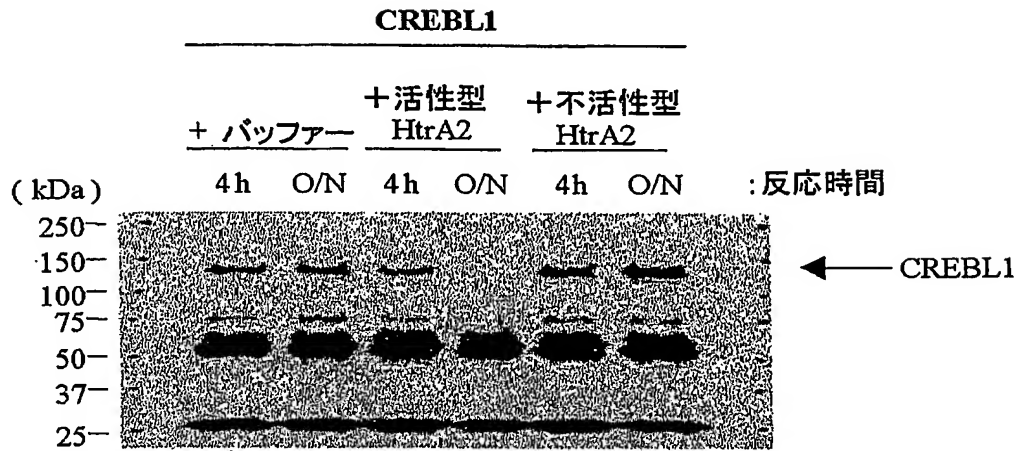
<210> 33
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the base sequence of SEQ ID NO:3
for use as a primer

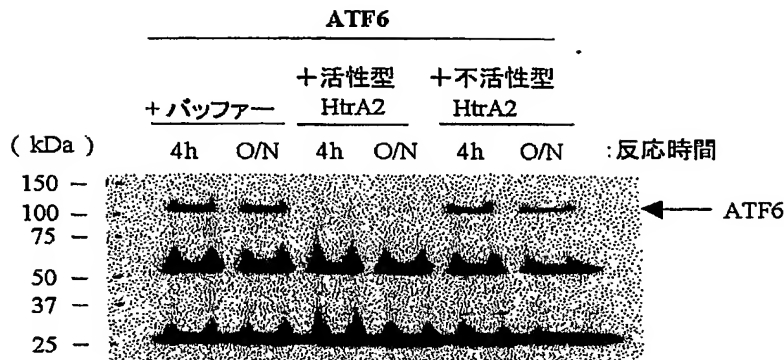
<400> 33
gagctcatgg gcgtccctag cccgccgccc gcttct 36

【書類名】図面

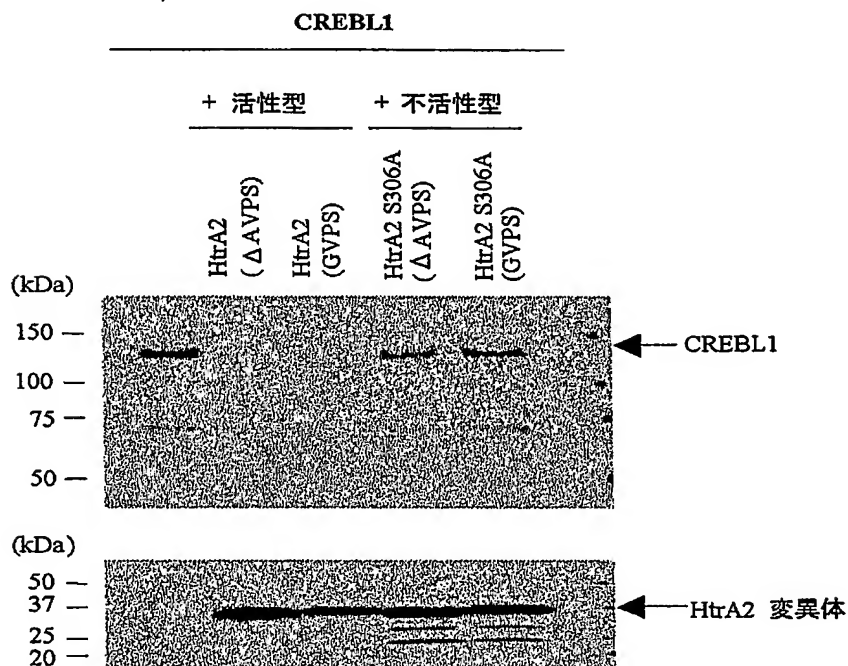
【図 1-A】



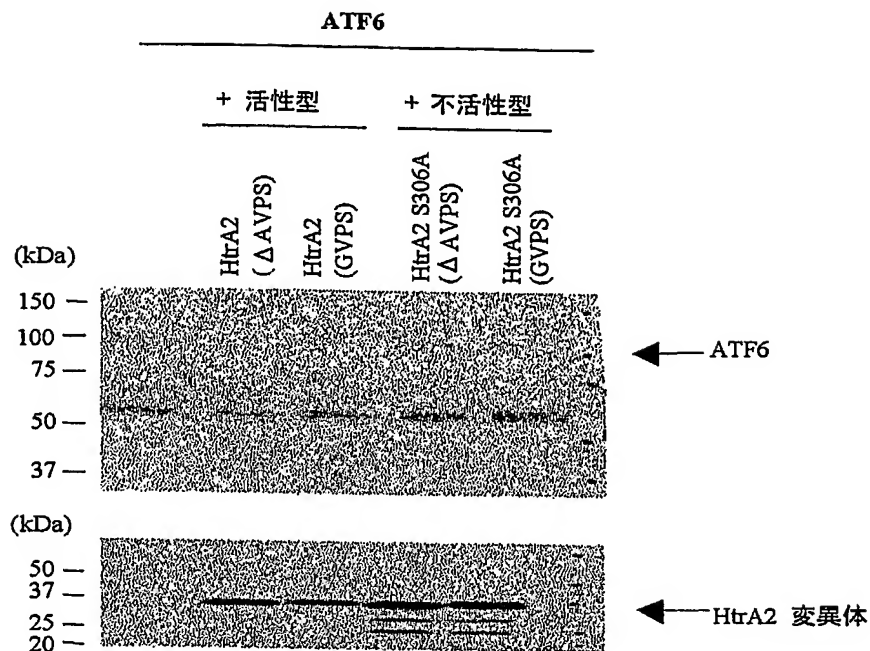
【図 1-B】



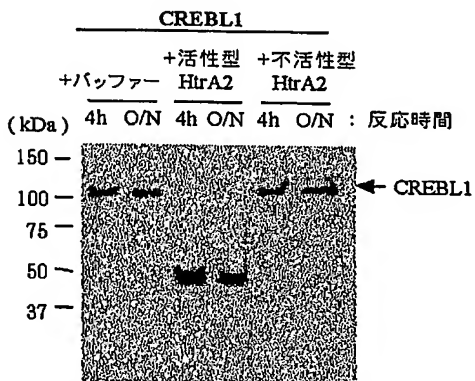
【図 2-A】



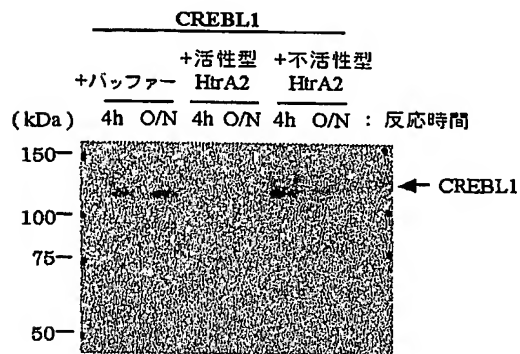
【図 2-B】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 H t r A 2 と相互作用する蛋白質を見出し、H t r A 2 による該蛋白質の分解に基づく疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供すること。

【解決手段】 H t r A 2 により C R E B L 1 および A T F 6 が分解されることを見出したことに基づいて、C R E B L 1 および／または A T F 6 の分解、より具体的には H t r A 2 による C R E B L 1 および／または A T F 6 の分解、を阻害することを特徴とする細胞死阻害手段、例えば膵臓 β 細胞の細胞死阻害手段、さらには膵臓 β 細胞の細胞死に基づく疾患の、具体的には糖尿病の防止および／または治療のための手段を提供する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-342587
受付番号	50301623562
書類名	特許願
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成15年10月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 9月30日
-------	-------------

特願 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 8 3 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋 3 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名

第一製薬株式会社

特願 2 0 0 3 - 3 4 2 5 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 5 2 0 6 2 8]

1. 変更年月日 2 0 0 0 年 1 0 月 2 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地 幕張テクノガーデン D
1 7

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.